

30.06.00

JP00/3647
日 本 国 特 許 庁PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT
09/774178

REC'D 18 AUG 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月 4日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第157653号

出 願 人

Applicant (s):

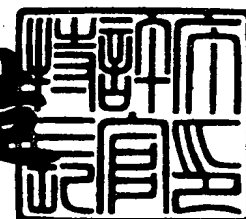
東ソー株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3060316

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA210-9843

【提出日】 平成11年 6月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明の名称】 増強された核酸増幅法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区たちばな台 2-7-3-217

 【氏名】 石塚 哲也

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区岸根町 490-17

 【氏名】 石黒 敬彦

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県大和市桜森 2-20-16-101

 【氏名】 斉藤 寿一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県海老名市国分寺台 4-11-13

 【氏名】 酒井 智美

【特許出願人】

 【識別番号】 000003300

 【氏名又は名称】 東ソー株式会社

 【代表者】 田代 圓

 【電話番号】 (03)-3505-4471

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 003610

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 増強された核酸増幅法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特定塩基配列を含む試料中の標的RNAを鋳型として、プロモーター配列を有し前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列と相補的な配列からなるRNAを転写可能な2本鎖DNAを生成し、RNAポリメラーゼによって前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列に相補的な配列からなるRNA転写産物を生成し、更に、該RNA転写産物を鋳型として前記2本鎖DNAを生成する工程からなるRNA増幅工程において、RNAポリメラーゼの基質としてアデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸に加え、イノシン三リン酸を添加する、前記標的RNAの増幅方法。

【請求項2】 RNAポリメラーゼとしてファージSP6のRNAポリメラーゼを用い、イノシン三リン酸を終濃度が0.5 mM～2 mMの範囲となるように添加することを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。

【請求項3】 添加するイノシン三リン酸の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が0.5対1.0～1.5対1.0の範囲であることを特徴とする請求項2に記載の増幅方法。

【請求項4】 RNAポリメラーゼとしてファージT7のRNAポリメラーゼを用い、イノシン三リン酸を終濃度が1.0 mM～2.7 mMの範囲となるように添加することを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。

【請求項5】 添加するイノシン三リン酸の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が0.3対1.0～0.7対1.0の範囲であることを特徴とする請求項4に記載の増幅方法。

【請求項6】 前記RNA増幅工程は、特定塩基配列に相補的な配列を有するプライマー及び特定塩基配列に相同的な配列を有するプライマー（ここで一方のプライマーは、5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプロモータープライマーである）を用い、標的RNAを鋳型としてRNA依存性DNAポ

リメレースにより1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメレースを用いることで、特定塩基配列又は特定塩基配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成すること、そして、該2本鎖DNAがRNAポリメレース存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメレースによる1本鎖DNA生成の鋳型となるものであることを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。

【請求項7】請求項1に記載の増幅工程をインターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブの存在下で実施し、反応液の蛍光強度を経時的に測定することからなる、標的核酸の分析方法。

【請求項8】前記インターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、RNA転写産物との相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする、請求項7に記載の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAやRNA等の遺伝子混合物中に含まれると予想される、特定塩基配列を含む標的RNAの増幅方法に関するものであり、更には、標的RNAを増幅し、定性的又は定量的に分析方法に関するものである。本発明は遺伝子診断等の臨床診断分野での利用に有用であり、更には、食品中、室内、土壤中、河川中、海洋中等の環境中の微生物の定性又は定量を行う際に有用である。

【0002】

【従来の技術】

一般的に、ウイルス感染症の診断では、臨床試料中の核酸（ウイルス核酸）が極微量であることが多いため、高感度かつ良好な再現性の測定を実現するために信号強度を向上し高感度化する目的で、標的核酸を増幅する方法がとられる。例えば核酸中の特定のDNA配列を増幅する方法として、ポリメレースチェインリアクション（PCR）法が知られている。この方法は、特定のDNA配列の両末端部に相補的なプライマー及び相同なプライマーからなる一組のプライマーと熱耐性

DNAポリメラーゼを用いて、熱変性、プライマー・アニール、伸長反応からなるサイクルを繰り返し行うことにより特定のDNA配列を増幅するものである。

【0003】

特定塩基配列を含むRNA（標的RNA）の増幅法としては、NASBA法や3SR法等が知られている。この方法は、標的RNAに対してプロモーター配列を含むプライマーと逆転写酵素及びリボヌクレースIIを用いて、プロモーター配列を含む2本鎖DNAを生成し、RNAポリメラーゼにより、特定塩基配列を含むRNAを生成し、以後は、該生成されたRNAを前記プロモーター配列を含む2本鎖DNA合成の鋳型とする連鎖反応を生じさせるものである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

一般に、PCRでRNAを増幅する場合、PCRに先だってRNAを鋳型とする逆転写反応を行い、一旦cDNAを合成する、いわゆるRT-PCR法を行わなければならない、実質的に2段階の工程が要求されることとなる。またPCRは急激な昇温、降温を必要とするため、特殊なインキュベーターを必要とし、大量処理を目的とした自動化への適用が容易ではないという課題もある。

【0005】

一方、前記したようなRNAの増幅法は、比較的一定温度での反応が可能であるため自動化への適用が容易である。しかし、試料中に存在する極微量の標的RNAをより高感度かつ再現性良く検出するためには、増幅効率を更に向上させる必要がある。

【0006】

本発明は、更に効率が向上された、試料中の標的RNAの増幅方法を提供するものである。また本発明は、試料中の標的RNAを更に効率的に増幅しつつ、増幅されたRNAを分析する、標的RNAの分析方法である。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、RNAポリメラーゼを用いるRNAの増幅工程において、その基質であるリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸

、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸)に加え、更にイノシン三リン酸(以下、「ITP」と略する)を添加することで、増幅効率を向上し得ることを見出し本発明を完成するに至った。

【0008】

本願請求項1の発明は、特定塩基配列を含む試料中の標的RNAを鋳型として、プロモーター配列を有し前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列と相補的な配列からなるRNAを転写可能な2本鎖DNAを生成し、RNAポリメラーゼによって前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列に相補的な配列からなるRNA転写産物を生成し、更に、該RNA転写産物を鋳型として前記2本鎖DNAを生成する工程からなるRNA増幅工程において、RNAポリメラーゼの基質としてアデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸に加え、ITPを添加する標的RNAの増幅方法である。

【0009】

本願請求項2の発明は、請求項1の発明に係り、RNAポリメラーゼとしてファージSP6のRNAポリメラーゼを用い、ITPを終濃度が0.5mM～2mMの範囲となるように添加することを特徴とする。本願請求項3の発明は、請求項2の発明に係り、添加するITPの終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸(アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸)の終濃度の比率が0.5対1.0～1.5対1.0の範囲であることを特徴とする。

【0010】

本願請求項4の発明は、請求項1の発明に係り、RNAポリメラーゼとしてファージT7のRNAポリメラーゼを用い、ITPを終濃度が1.0mM～2.7mMの範囲となるように添加することを特徴とする。本願請求項5の発明は、請求項4の発明に係り、添加するITPの終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸(アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸)の終濃度の比率が0.3対1.0～0.7対1.0の範囲であることを特徴とする。

【0011】

本願請求項6の発明は、請求項1の発明に係り、前記RNA増幅工程が、特定塩基配列に相補的な配列を有するプライマー及び特定塩基配列に相同的な配列を有するプライマー（ここで一方のプライマーは、5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプロモータープライマーである）を用い、標的RNAを鋳型としてRNA依存性DNAポリメラーゼにより1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼを用いることで、特定塩基配列又は特定塩基配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成すること、そして、該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによる1本鎖DNA生成の鋳型となるものであることを特徴とする。

【0012】

本願請求項7の発明は、請求項1の発明に関連し、その増幅工程をインターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブの存在下で実施し、反応液の蛍光強度を経時的に測定することからなる標的核酸の分析方法である。そして本願請求項8の発明は、請求項7の発明に係り、前記インターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、RNA転写産物との相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする。

【0013】

本発明は、RNAポリメラーゼがDNAを鋳型としてRNAを生成する際に、ITPが存在するとRNA生成効率が向上するという知見に基づくものである。

【0014】

本発明は、例えば以下(A)～(I)の試薬を用意し、標的RNAを含むと予想される試料にこれらを順次添加するか、これらの2以上を一度に添加するか、又はこれらを一度に添加する操作により実施することが可能である（(A)～(I)は、この順に添加することを要しない）。

【0015】

(A) 前記1本鎖RNA中の特定塩基配列の3'側末端配列に相補的な配列を

有する第1の1本鎖オリゴヌクレオチド、

(B) RNA依存性DNAポリメラーゼ、

(C) デオキシリボヌクレオシド三リン酸

(D) リボヌクレエースHまたは同等のRNA分解活性を有する酵素、

(E) 5'末端側から順に(1) DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター配列、(2) 該プロモーターのエンハンサー配列及び(3) 前記1本鎖RNA中の特定塩基配列の5'末端配列と同一の塩基配列を有する第2の1本鎖オリゴヌクレオチド、

(F) DNA依存性DNAポリメラーゼ、

(G) DNA依存性RNAポリメラーゼ、

(H) リボヌクレオシド三リン酸(アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸)、

(I) ITP。

【0016】

また例えば、また、上記試薬(A)及び試薬(E)の、第1及び第2の1本鎖オリゴヌクレオチドの組み合わせを用いる以外に、以下の試薬(J)及び試薬(K)の第1及び第2の1本鎖オリゴヌクレオチドの組み合わせを用いてもよい。

【0017】

(J) 5'末端側から順に(1) DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター配列、(2) 該プロモーターのエンハンサー配列及び(3) 標的RNA中の特定塩基配列の3'側末端配列に相補的な配列を有する第1の1本鎖オリゴヌクレオチド、

(K) 標的RNA中の特定塩基配列の5'側末端配列と同一の塩基配列を有する第2の1本鎖オリゴヌクレオチド。

【0018】

上記において特定塩基配列とは、上記(A)および(E)の第1及び第2の1本鎖オリゴヌクレオチドを使用した場合、5'末端が(E)の第2の1本鎖オリゴヌクレオチドにおける(3)の配列で始まり、3'末端が(A)の第1の1本鎖オリゴヌクレオチドと相補的な配列で終わる、標的RNA中に存在する塩基配

列部分である。また上記（J）及び（K）の第1及び第2の1本鎖オリゴヌクレオチドを使用した場合には、5'末端が（K）の第2の1本鎖オリゴヌクレオチドと同一な配列で始まり、3'末端が（J）の第1の1本鎖オリゴヌクレオチドにおける（3）の配列に相補的な配列で終わる、標的RNA中に存在する塩基配列部分である。特定塩基配列は任意に決定することができるが、標的RNAを他の核酸から区別し得る程度に特異的な配列部分を含むようにすることが重要である。

【0019】

試薬（A）は、特定塩基配列の3'末端に相補的な配列を有する第1の1本鎖オリゴヌクレオチドである。該試薬は標的RNAに相補結合し、後述する試薬（B）及び（C）の共存下で、RNA依存性DNAポリメラーゼによる標的RNAを鋳型とするcDNA合成が行われる際に、該cDNAの5'側末端に特定塩基配列の3'末端と相補的な配列が位置するようにするためのものである。

【0020】

試薬（B）はRNA依存性DNAポリメラーゼであり、試薬（C）はその基質となるデオキシリボヌクレオシド三リン酸である。試薬（A）～（C）の共存下で、標的RNA中の特定塩基配列の3'末端に相補的な配列を5'末端に持つcDNAが合成される。このcDNAは、鋳型となったRNAと、DNA-RNA 2本鎖を形成した状態である。

【0021】

試薬（D）は、上記DNA-RNA 2本鎖中のRNAを切断する活性を有するリボヌクレースHであるが、同等のRNA分解活性を有する酵素を用いることもできる。トリ筋芽細胞腫ウイルス逆転写酵素（以下、AMV逆転写酵素）に代表される逆転写酵素は、DNA-RNA 2本鎖中のRNAを切断する活性を有しており、この種の酵素を用いることが例示できる。

【0022】

試薬（E）は、5'末端側から順に（1）DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター配列、（2）該プロモーターのエンハンサー配列及び（3）特定塩基配列の5'末端配列と同一の塩基配列を有する第2の1本鎖オリゴヌクレオチ

ドである。第2のオリゴヌクレオチドにおいて、(3)の部分は試薬(A)～(D)が共存することで合成されるcDNAの3'末端に結合する。従って試薬(C)と(F)の共存により、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端から該cDNAを鋳型として、また同時に該cDNAの3'末端から該第2のオリゴヌクレオチドを鋳型として、DNA依存性DNAポリメラーゼによりそれぞれの相補鎖が合成され、転写可能なプロモーター配列を有する完全な2本鎖DNAが合成される。

【0023】

試薬(F)はDNA依存性DNAポリメラーゼである。AMV逆転写酵素に代表される逆転写酵素には、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するものがあり、この種の酵素を用いてもよい。

【0024】

試薬(G)は、DNA依存性RNAポリメラーゼであり、試薬(H)と(I)はその基質となるリボヌクレオシド三リン酸及びITPである。試薬(C)、(E)及び(F)の共存により合成される2本鎖DNAは、DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター領域を末端に有する。このため、試薬(G)及び(H)の共存下では該DNA合成後、直ちに特定塩基配列からなる1本鎖RNAの合成が開始される。ここで、前述の通り、試薬(I)を共存させることにより該RNAの合成量を飛躍的に増大することができる。試薬(G)におけるDNA依存性RNAポリメラーゼとしては、具体的に例えばT7 RNAポリメラーゼやT3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等を例示することができる。

【0025】

試薬(G)～(I)の共存により合成される1本鎖RNAは特定塩基配列からなるRNAである(一部ITPに置換されている)。従って、これらが合成されて試薬(A)～(F)と共存することにより、上述した一連の反応が繰り返し生じることとなる。このように、本発明では試料中に存在する極微量の標的RNAをもとにして前記の如きプロモーター領域を末端にもつ2本鎖DNAが合成され、これが特定塩基配列からなる1本鎖RNAの合成源となる。合成された1本鎖R

NAは新たな2本鎖DNAの合成に寄与し、結果として時間の経過とともに特定塩基配列からなる1本鎖RNA量は飛躍的に増大する。

【0026】

本発明の分析方法は、例えば前記のようなRNAの増幅工程において、試薬(L)を添加し、反応液の蛍光強度を測定する工程を含む、標的RNAの分析方法である。

【0027】

(L) 前記特定塩基配列に相補的な配列を有し、該配列を有する核酸と結合した場合に測定可能な蛍光信号を発するように標識された第3の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0028】

この第3のオリゴヌクレオチドは、例えばインターカレーター性蛍光色素が結合されたDNAであれば良い。該DNA部分は、特定塩基配列の特異的分析のため、6～100ヌクレオチド、更に好ましくは10～30ヌクレオチドとすることが好ましい。むしろ該DNA部分は、特定塩基配列中に存在する配列であって、標的核酸以外の核酸と十分に区別可能な配列部分と相補的な配列であることが重要である。また、DNA部分は合成された特定塩基配列からなる1本鎖RNAと相補結合を形成した場合に、既に添加されている試薬(C)におけるRNA依存性DNAポリメラーゼが作用してその3'末端からの伸長が生じないように、該3'末端が特定塩基配列と非相補的な配列が付加されているか、または、その3'末端が化学的に修飾されていることが好ましい。

【0029】

インターカレーター性蛍光色素は、DNA部分が他の核酸と相補結合を形成すると2本鎖部分にインターカレーションして蛍光特性が変化するものである。この目的のためには、インターカレーター性蛍光色素を、2本鎖部分へのインターカレーションを妨げない程度の適当な分子長リンカーを介してDNAと結合することが例示できる。かかるリンカーとしては、インターカレーター性蛍光色素が2本鎖部分にインターカレーションすることを妨げない分子であれば特に制限はない。特に両末端に官能基を有する二官能性炭化水素から選択されるリンカー分子

は、オリゴヌクレオチドへの修飾を行う上で簡便で好ましい。また、例えば、市販の試薬セット (C6-Thiol modifier, 商品名、Clontech 製) 等を使用することもできる。

【0030】

インターカレーター性蛍光色素としては、2本鎖にインターカレーションすることで、例えば発する蛍光波長が変動したりする等、その蛍光特性が変化するものであれば特に制限はないが、測定の容易さ等の観点からインターカレーションにより蛍光強度が増加する性質を有するものが特に好ましい。より具体的には特に蛍光強度の変化が著しいチアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー又はそれらの誘導体を特に好ましいインターカレーター性蛍光色素として例示できる。

【0031】

インターカレーター性蛍光色素をリンカーを介してDNAに結合させる位置は、DNAの5'末端、3'末端又は中央部等、インターカレーター性蛍光色素の2本鎖へのインターカレーションが妨げられず、かつ、DNA部分とRNAとの相補結合を阻害しない限り特に制限はない。

【0032】

プロモーター配列を有する2本鎖DNAを鋳型として試薬 (G) ~ (I) により合成される1本鎖RNA量は経時的に増加する。そこで、試薬 (L) を、上記標的RNAを含むと予想される試料に、少なくとも試薬 (A) ~ (I) とともに共存させ、増加する特定塩基配列からなる1本鎖RNAを、蛍光信号として測定する。ここで、合成された1本鎖RNAと試薬 (L) の第3のオリゴヌクレオチドが相補結合を形成し、蛍光信号を発した場合であっても、このRNAは試薬 (A) ~ (C) 共存下でのDNA合成における鋳型として機能することが明らかとなった。即ち本発明では、各試薬の共存状態においてRNAからのcDNA合成、2本鎖DNAの合成、2本鎖DNAからのRNA合成という一連の現象が、第3のオリゴヌクレオチド共存下で生じ、RNAの増加に比例して蛍光強度が増加する。

【0033】

本発明で、上記試薬 (A) 及び (E) に代えて試薬 (J) 及び (K) を用いる

のであれば、前記試薬(L)に代えて以下の(M)を用いることにより、特定核酸を分析することが可能である。

【0034】

(M) 標的RNA中の特定塩基配列に同一な配列を有し、該配列と相補的配列を有する核酸と結合した場合に測定可能な蛍光信号を発するように標識された第3の1本鎖オリゴヌクレオチド。

【0035】

試薬(J)は、5'側末端から順に(1)DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター配列、(2)該プロモーターのエンハンサー配列及び(3)前記1本鎖RNA中の特定塩基配列の3'側末端配列に相補的な配列を有する第1の1本鎖オリゴヌクレオチドである。該試薬の(3)の部分は特定塩基配列中の3'側末端に相補結合し、試薬(A)を用いた場合と同様に、試薬(B)および(C)および(D)の存在下で、標的RNAに相補的なcDNAが合成される。試薬(K)は、該cDNAの特定塩基配列中の5'側末端に相補的配列を有する1本鎖オリゴヌクレオチドである。該試薬(K)は、該cDNAの特定塩基配列中の5'側末端に相補的結合をした後、試薬(C)および試薬(F)の共存により、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する2本鎖DNAが合成される。更に該2本鎖DNAは、試薬(G)～(H)の共存により、特定塩基配列に相補的な第2の1本鎖RNAが合成される。更に試薬(I)を共存させることにより、該1本鎖RNAの合成量は飛躍的に増大する。

【0036】

更に、該第2のRNAの3'側末端は試薬(K)と相補結合し、試薬(B)～(D)の共存下で、該第2のRNAの第2のcDNAが合成される。該第2のcDNAは試薬(J)の(3)部分と相補結合し、試薬(C)および試薬(F)によりプロモーター配列を含有する2本鎖DNAが合成され、試薬(G)～(I)により該第2のRNAが合成される。合成された特定塩基配列に相補的な該第2のRNAは、新たな2本鎖DNAの合成源となり、一連の反応が繰り返し生じることにより、結果として該第2のRNAの量は飛躍的に増大する。

【0037】

ここで得られた該第2のRNAは、標的RNA中の特定塩基配列と相補的な配列を有する。特定塩基配列と同一な配列を有し、かつインターカレーター性蛍光色素で標識された第3の1本鎖オリゴヌクレオチドである試薬(M)を共存させることにより、合成された該第2のRNA量に比例して蛍光強度が増加する。

【0038】

本願発明における蛍光信号の測定は、好ましくは試薬(A)～(I)および試薬(L)または試薬(M)の添加直後から、又は、添加後所定時間経過後から経時的に行う。試薬試薬(L)又は試薬(M)の第3のDNAは、1本鎖RNAの合成過程において、合成されたRNAと結合・解離を繰り返すが、結合時に測定される蛍光信号は各測定時における該RNAの存在量を反映するため、1本鎖RNAの増加する様子を経時的に追跡することが可能である。なお、測定自体は連続的なものであっても一定時間毎の間欠的なものであっても良い。また、蛍光信号の測定装置は、本願発明の一部を構成しないが、1本以上の反応管中の蛍光信号を連続的または一定時間毎の間欠的に測定できるものであれば如何なる装置を用いても良い。

【0039】

蛍光信号の測定時間は、一定量の標的RNAを含んだ試験区の蛍光強度が増加する時間が標的RNAを含まない試験区と有為に差の見られる時間を含み、一定量の標的RNAを含んだ試験区の蛍光強度がほぼ一定になるまでの時間で、概ね4時間、好適条件では1時間である。

【0040】

【発明の実施形態】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0041】

実施例1

標的核酸増幅におけるITP添加(終濃度0.1mM～2.0mM)の効果を検討した。

【0042】

(1) ヒトC型肝炎ウイルスRNAの塩基番号113~267 (加藤ら、Proc. Natl. Sci., USA、1990年、87、9524~9528) を標準RNA試料とし、260nmの紫外部吸収により定量後、RNA希釈液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA、0.5 U/ μ l RNase Inhibitor) を用い 10^6 、 10^4 コピー/ 4μ l となるよう希釈した。コントロール試験区 (Neg a) には、前記RNA希釈液のみを用いた。

【0043】

(2) 以下の組成の反応液15.2 μ lを0.5ml容PCR用チューブ (Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製) に分注し、これに上記RNA試料4 μ lを添加後、ミネラルオイル100 μ lを重層した。

【0044】

反応液の組成

59.2mM Tris-酢酸緩衝液 (pH8.1)

13.2mM 酢酸マグネシウム

123.7mM 酢酸カリウム

15.8% ソルビトール

19.7mM DTT

各1.0mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP

各2.0mMのATP, CTP, GTP, UTP

各種濃度 (0.2mM、1.0mM、2.0mM、3.0mM、4.0mM)

のITP

0.4 μ Mの第1のオリゴヌクレオチド (配列番号1)

0.4 μ MのSP6プロモーター配列を有する第2のオリゴヌクレオチド (配列番号2。配列中の「ATTTAGGTGACACTATA」部分はSP6プロモーター配列であり、また「GAATACAA」部分はエンハンサー配列である。

)

0.049 μ Mのインターカレーター性蛍光色素(図1)で標識された第3のオリゴヌクレオチド(配列番号3。配列中の「CTCGC」と「GGGGGCTG」の間にインターカレーター性蛍光色素が標識されており、またその3'末端はグリコール酸で修飾されている。以後、YO-271と略する。)

60ユニット リボヌクレエース インヒビター (宝酒造(株)製)

3.9% DMSO

容量調製用蒸留水

(3) 上記の反応液を、50℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液10.8 μ lを添加した。

【0045】

酵素液の組成

83.3 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH8.1)

18.5 mM 酢酸マグネシウム

174.1 mM 酢酸カリウム

22.2% ソルビトール

42ユニット AMV逆転写酵素 (宝酒造(株)製)

171ユニット SP6 RNAポリメラーゼ (宝酒造(株)製)

3 μ g 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付蛍光分光光度計を用い、50℃に保温して、励起波長490 nm、蛍光波長510 nmで、PCRチューブ内の反応溶液の蛍光強度を5分間隔で測定した。

【0046】

酵素液添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比(所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値)の経時変化を図2(RNAサンプル濃度 10^6 コピー/30 μ l、ITP終濃度0.1 mM~1.0 mM)、図3(RNAサンプル濃度 10^4 コピー/30 μ l、ITP終濃度1.0 mM~2.0 mM)に示した。

【0047】

これらのことから、RNAポリメラーゼとしてSP6 RNAポリメラーゼを用いた場合、0.5 mM～2 mMのITPを反応系内に添加することによって特定核酸の増幅効率は飛躍的に向上することが示された。また、陰性(Nega)のときには蛍光強度の増加が見られていないことから、蛍光強度の増加は特定塩基配列の増加を反映していることが示された。

【0048】

実施例2

標的核酸増幅におけるITP添加(終濃度0.5 mM～3.0 mM)の効果を検討した。

【0049】

(1) 前記ヒトC型肝炎ウイルスRNAを標準RNA試料とし、260 nmの紫外部吸収により定量後、RNA希釈液(10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mM EDTA、0.5 U/ μ l RNase Inhibitor)を用い 10^6 コピー/ 4μ lとなるよう希釈した。コントロール試験区(Nega)には、希釈液のみを用いた。

【0050】

(2) 以下の組成の反応液21.0 μ lを0.5 ml容PCR用チューブ(Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製)に分注し、これに上記RNA試料2.5 μ lを添加後、ミネラルオイル100 μ lを重層した。

【0051】

反応液の組成

47.6 mM Tris-塩酸緩衝液(pH8.5)

17.1 mM 塩化マグネシウム

185.7 mM 塩化カリウム

1.4 mM DTT

各0.7 mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP

各5.4 mMのATP, CTP, GTP, UTP

0.7、1.4、2.1、2.9、3.6、3.9あるいは4.3 mMのITP

1. 1 μ Mの第1のオリゴヌクレオチド（配列番号4）

1. 1 μ MのT7プロモータ配列を有する第2のオリゴヌクレオチド（配列番号5。配列中の「AATTCTAATACGACTCACTATA」部分はT7プロモータ配列であり、また「GGGAGA」部分はエンハンサー配列である。）

0.049 μ Mのインターカレーター性蛍光色素（図1）で標識された第3のオリゴヌクレオチド（配列番号6。配列中の「GTGCCCCCGCGAGA」と「CTGCTA」の間にインターカレーター性蛍光色素が標識されており、またその3'末端はグリコール酸で修飾されている。以後、YO-HC1bと略する。）

40ユニット リボヌクレエース インヒビター（宝酒造製）

21.4% DMSO

容量調製用蒸留水

（3）上記の反応液を、41℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液6.5 μ lを添加した。

【0052】

酵素液の組成

30.8 mM Tris-塩酸緩衝液（pH8.5）

7.8% ソルビトール

29ユニット AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）

142ユニット T7 RNAポリメラーゼ（東洋紡（株）製）

3 μ g 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

（4）引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付蛍光分光光度計を用い、41℃に保温して、励起波長490 nm、蛍光波長510 nmで、PCRチューブ内の反応溶液の蛍光強度を5分間隔で測定した。

【0053】

酵素液添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比（所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値）の経時変化を図4（RNAサンプル濃度 10^6 コピー／ $30\mu\text{l}$ 、ITP終濃度 $0.5\text{mM}\sim 3.0\text{mM}$ ）に示した。

【0054】

これより、T7 RNAポリメラーゼを用いた場合、ITPを 0.5mM 添加した場合より $1.0\text{mM}\sim 2.7\text{mM}$ 添加した場合の方が特定核酸の増幅効率は飛躍的に向上することが示された。また、陰性（Nega）の場合には蛍光強度の増加が見られていないことから、特定塩基配列のRNAを検出していることが示された。

【0055】

実施例3

インターカレーター性蛍光色素（図1）で標識された第3のオリゴヌクレオチドおよび第4のオリゴヌクレオチドによる特異産物の検出を検討した。

【0056】

（1）前記ヒトC型肝炎ウイルスRNAを標準RNA（HCV-RNA）、合成RNA（WQ-RNA、配列番号7）を、RNA希釈液（ 10mM Tris-HCl（ $\text{pH}8.0$ ）、 0.1mM EDTA、 $0.5\text{U}/\mu\text{l}$ RNase Inhibitor）を用い、 10^5 コピー／ $4\mu\text{l}$ となるよう希釈した。コントロール試験区（Nega）には、希釈液のみを用いた。

【0057】

WQ-RNA（配列）：

（2）以下のRNAサンプル、インターカレーター性蛍光色素（図1）で標識されたオリゴヌクレオチドの組み合わせになるように（3）で溶液を調整した。

【0058】

RNAサンプル 蛍光色素標識オリゴヌクレオチド

①HCV RNA 第3オリゴヌクレオチド（YO-271）

②WQ-RNA 第3オリゴヌクレオチド（YO-271）

③Nega 第3オリゴヌクレオチド（YO-271）

- ④WQ-RNA 第4オリゴヌクレオチド (YO-WT)
- ⑤HCV RNA 第4オリゴヌクレオチド (YO-WT)
- ⑥Neg a 第4オリゴヌクレオチド (YO-WT)

(3) 以下の組成の反応液15.2 μ lを0.5ml容PCR用チューブ (Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー製) に分注し、これに上記RNA試料4 μ lを添加後、ミネラルオイル100 μ lを重層した。

【0059】

反応液の組成

- 59.2mM Tris-酢酸緩衝液 (pH8.1)
- 13.2mM 酢酸マグネシウム
- 123.7mM 酢酸カリウム
- 15.8% ソルビトール
- 19.7mM DTT
- 各1.0mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 各2.0mMのATP, CTP, GTP, UTP
- 2.5mMのITP
- 0.4 μ Mの第1のオリゴヌクレオチド (配列番号1)
- 0.4 μ MのSP6プロモータ配列を有する第2のオリゴヌクレオチド (配列番号2)
- 0.049 μ Mのインターカレーター性蛍光色素 (図1) で標識された第3のオリゴヌクレオチド (YO-271) 又はインターカレーター性蛍光色素 (図1) で標識された、YO-271とは異なる第4のオリゴヌクレオチド (配列番号8. 配列中の「GAATGGGATA」と「GAGTGCATCCAGTG」の間にインターカレーター性蛍光色素が標識されており、その3'末端はグリコール酸で修飾されている。以後YO-WTと略する)。

【0060】

- 60ユニット リボヌクレエース インヒビター
- 3.9% DMSO

容量調製用蒸留水

(4) 上記の反応液を、50℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液10.8 μ lを添加した。

【0061】

酵素液の組成（各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度）

83.3 mM Tris-酢酸緩衝液（pH8.1）

18.5 mM 酢酸マグネシウム

174.1 mM 酢酸カリウム

22.2% ソルビトール

42ユニット AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）

171ユニット SP6 RNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）

3 μ g 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(5) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付蛍光分光光度計を用い、50℃に保温して、励起波長490nm、蛍光波長510nmで、PCRチューブ内の反応溶液の蛍光強度を5分間隔で測定した。

【0062】

酵素液添加時の時刻を0分として、各サンプルの蛍光強度比（所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値）の経時変化を求めた結果を図5に、増幅後のサンプルの4%アガロース電気泳動の結果を図6に示した。図5より標的RNAと、その相補的な蛍光色素で標識したオリゴヌクレオチド（HCVとYOO-271、WQとYOO-WT）を用いた時のみ、蛍光増加が観測された。図6より、RNA試料が存在していたサンプル（レーン1、2、4、5）は特異的なバンドが検出された。以上のことより、ITP添加した際にも、得られた蛍光強度は特異的産物の増幅のみを反映していることが示された。

【0063】

【発明の効果】

以上の説明から明らかなように、本発明によれば、試料中の特定塩基配列を含む1本鎖RNAについて、反応液を急激に昇温・降温するという操作を繰り返す

ことなく、概ね一定温度で、反応開始時に行う 1 段階の手動操作のみで、かつ、迅速に試料中に元来存在した特定 RNA 配列を増幅する方法において、ITP を添加することによって増幅効率を飛躍的に向上させることが可能となる。

【 0 0 6 4 】

また、本発明では、試料中の標的 RNA をもとにして、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼのプロモーター領域を末端にもつ 2 本鎖 DNA が合成され、これが多量の 1 本鎖 RNA の合成源になり、さらに合成された 1 本鎖 RNA 量は飛躍的に増大し、インターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、生成した 1 本鎖 RNA と相補結合することによる蛍光増加を測定する工程において、蛍光強度が増加する過程を解析することにより、簡便かつ、迅速に初期 RNA 量を決定する方法を提供することができる。

【 0 0 6 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tosoh Corporation

<120> 増強された核酸増幅法

<130> PA210-9843

<160> 10

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 1 のオリゴヌクレオチド

<400> 1

gcctttcgcg acccaaca

18

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 2 のオリゴヌクレオチド

<400> 2

atttaggtga cactatagaa tacaacctcc cgggagagcc atagtgtct

50

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 3 のオリゴヌクレオチド

<400> 3

ctcgcggggg ctg

13

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 1 のオリゴヌクレオチド

<400> 4

cctccccgga gagccatagt ggtc

24

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 2 のオリゴヌクレオチド

<400> 5

aatttctaata cgactcacta tagggagagc ctttcgcgac ccaacact

48

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 3 のオリゴヌクレオチド

<400> 6

gtgcccccgag gagactgcta

20

<210> 7

<211> 102

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトC型肝炎ウイルス合成RNA

<400> 7

gaauacaacc ucccgggaga gccauagugg ucugcgacug ucaucuaucu acacugucca 60
cuggaugcac ucuaucccau ucaguguugg gucgcgaaag gc 102

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第4のオリゴヌクレオチド

<400> 8

gaatgggata gagtgcattcc agtg 24

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1～3で用いたインターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドのインターカレーター性蛍光色素部分の化学構造である。B₁～B₃は核酸塩基を示す。

【図2】

実施例1で行った初期RNA量10⁶コピー/30μlにおいて、ITPの終濃度を0.1mM～1.0mMとした際の反応時間と蛍光強度比のグラフである

。N e g aとはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いたサンプルのことである。

【図3】

実施例1で行った初期RNA量 10^4 コピー/ $30\mu\text{l}$ において、ITPの濃度を $1.0\sim 2.0\text{mM}$ とした際の反応時間と蛍光増加率のグラフである。N e g aはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いた。

【図4】

実施例2で行った初期RNA量 10^6 コピー/ $30\mu\text{l}$ において、ITPの濃度を $0.5\text{mM}\sim 3.0\text{mM}$ とした際の反応時間と蛍光増加率のグラフである。N e g aとはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いたサンプルのことである。

【図5】

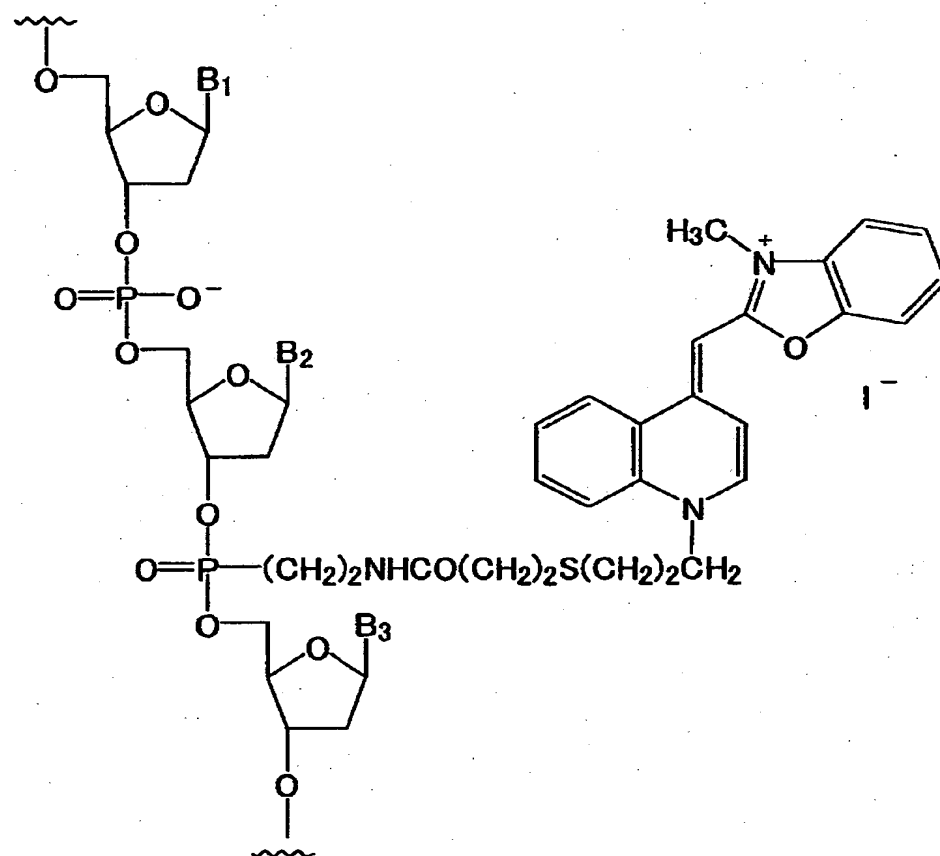
実施例3で行った、2種類のRNA試料（HCVとWQ）のそれぞれに相補的な、蛍光性色素で標識したオリゴヌクレオチド（YO-271とYO-WT）による特異産物の検出の反応時間と蛍光強度比のグラフである。初期RNA量は 10^5 コピー/ $3.0\mu\text{l}$ で実施した。表中のN e g aとはRNA試料の代わりに希釈液を用いたサンプルのことを表している。特異的な組み合わせ（HCVとYO-271、WQとYO-WT）のみ蛍光増加が見られた。

【図6】

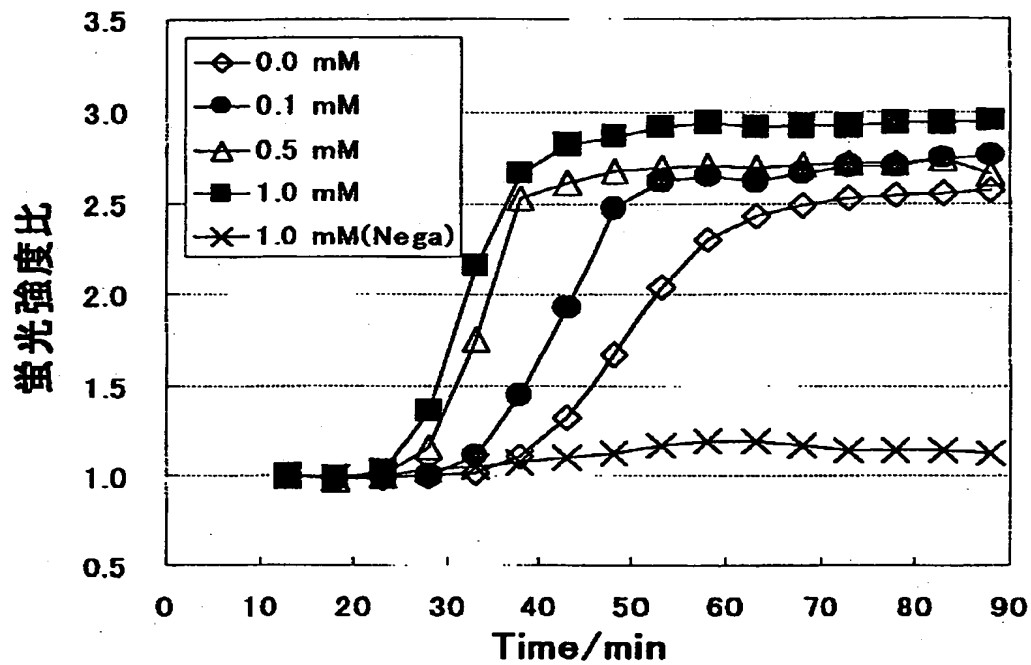
実施例3で反応させた後のサンプルの4%アガロースゲル電気泳動の結果を示す、階調反転写真である。RNA試料が存在していたサンプル（レーン1、2、4、5）では特異的なバンドが検出された。レーン7、8はHCV-RNA（155bp）とWQ-RNA（102bp）の標品である。分子量マーカースには $\phi\text{X174}/\text{HaeIII}$ を使用した。

【書類名】 図面

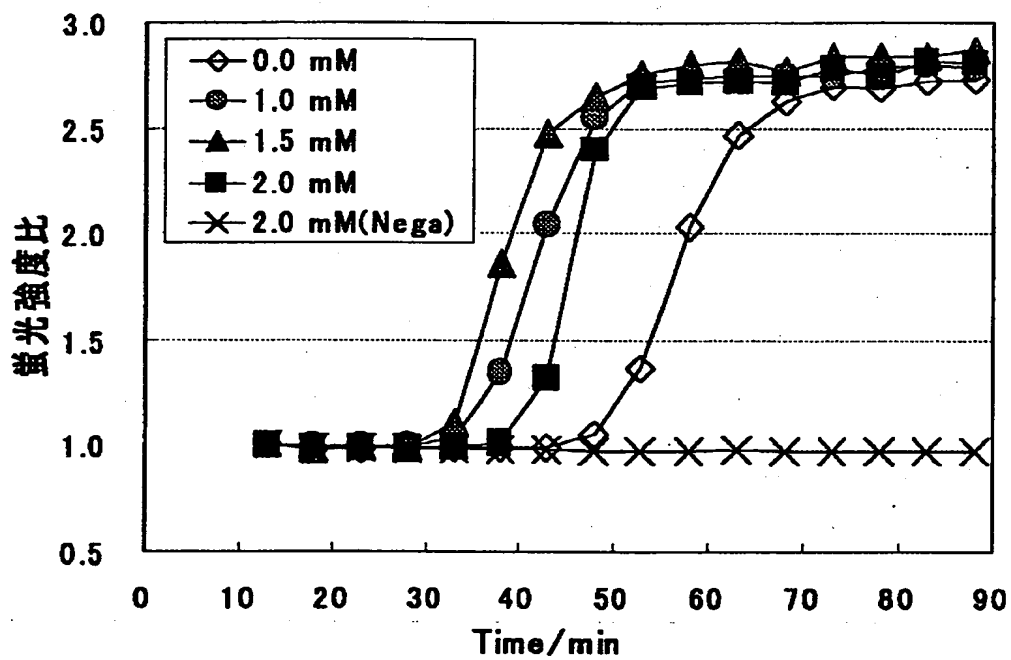
【図 1】



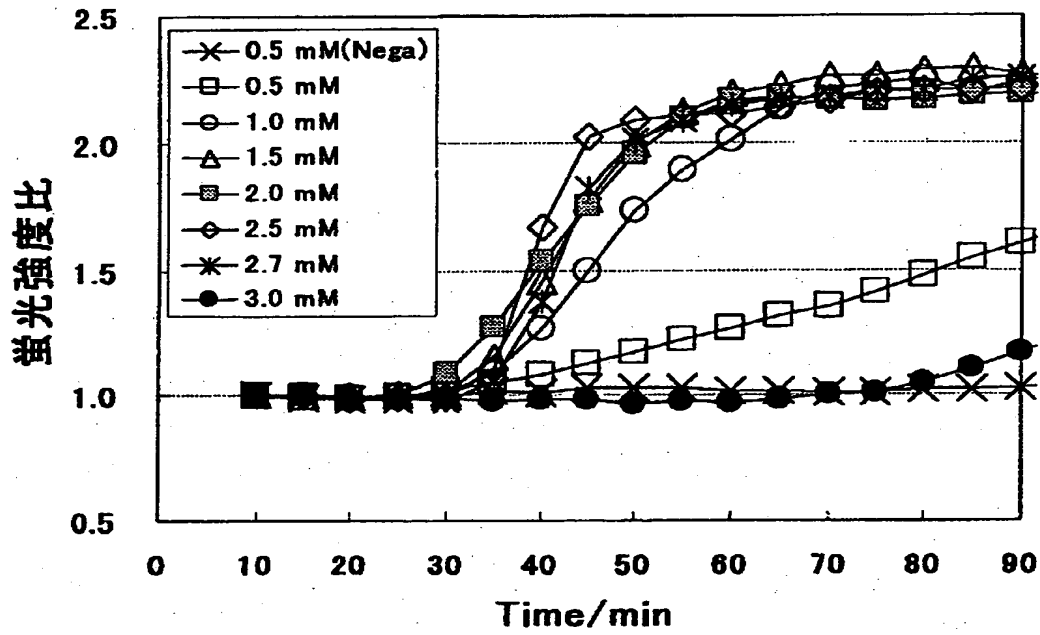
【図 2】



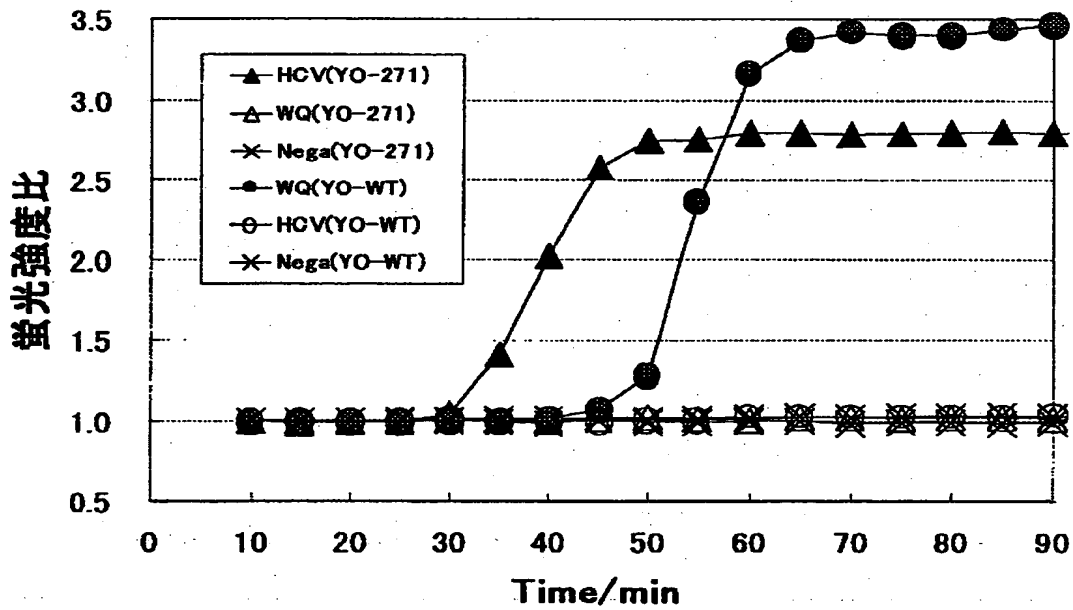
【図 3】



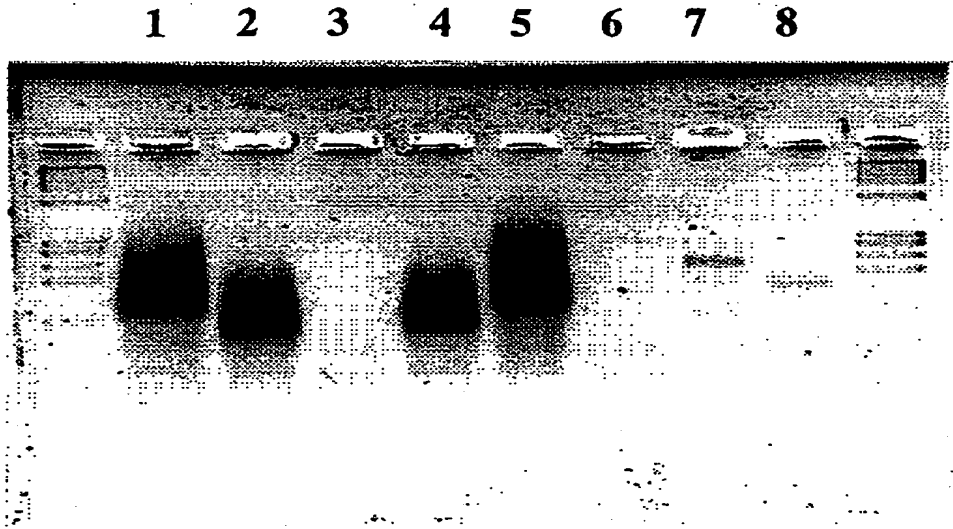
【図4】



【図5】



【図 6】



1. HCV(YO-271)
3. Nega(YO-271)
5. HCV(YO-WT)
7. HCV(155bp)

2. WQ(YO-271)
4. WQ(YO-WT)
6. Nega(YO-WT)
8. WQ(102bp)

【書類名】要約書

【要約】概ね一定温度で、簡便かつ迅速に、試料中に元来存在した特定RNA配列を飛躍的に増幅させる方法。

【解決手段】特定核酸を含むと予想される試料中の特定核酸分析において、試料中の特定RNA配列を鋳型として、特定RNA配列と相補的および相同的配列を含み、該配列を転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成し、RNAポリメラーゼによってRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が更に2本鎖DNAの鋳型となるRNA増幅工程において、RNAポリメラーゼの基質としてアデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸に加え、イノシン三リン酸を添加することにより増幅反応の効率を向上させる特定核酸増幅方法。

【選択図】図3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003300]

1. 変更年月日	1990年12月 2日
[変更理由]	住所変更
住 所	山口県新南陽市開成町4560番地
氏 名	東ソー株式会社

